

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑬ DE 35 02 141 C2

⑮ Int. Cl. 5:  
**C 12 P 1/00**

C 12 N 11/00  
C 12 P 17/04  
C 12 P 7/40  
C 12 P 7/60  
C 12 P 7/58  
C 12 P 17/06  
C 12 P 19/02  
C 12 P 7/44  
C 07 D 307/62  
C 07 H 3/02

Innthalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der  
angewandten Forschung e.V., 8000 München, DE

⑰ Vertr. ter:

Kraus, W., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Weisert, A.,  
Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

⑱ Erfinder:

Kulbe, Klaus, Prof. Dr., 7034 Gärtringen, DE; Knopki,  
Gisela, 7000 Stuttgart, DE

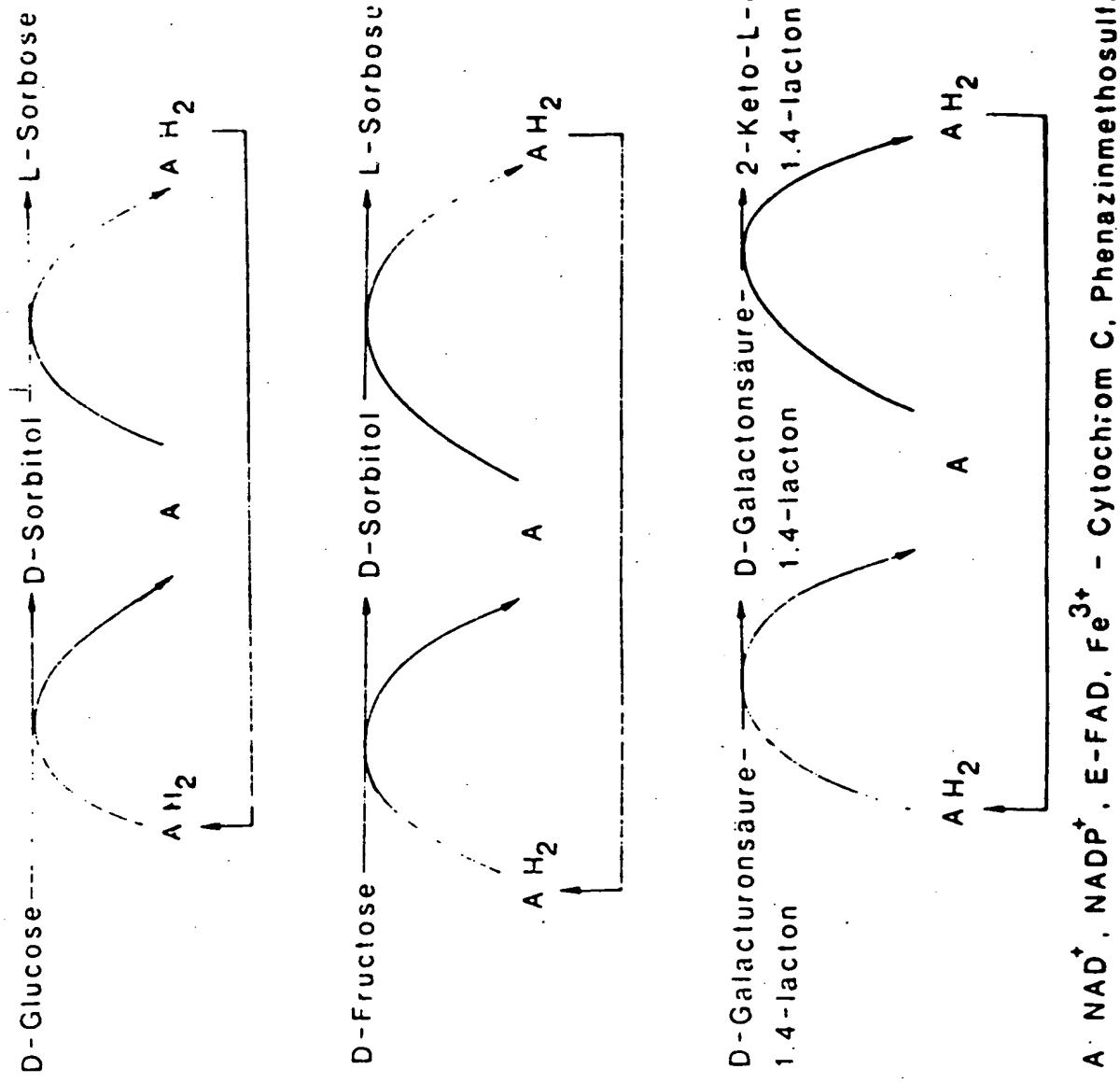
⑲ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

NICHTS ERMITTELT

⑳ Vorfahr zur intrasequentiellen Cofaktor-Regeneration bei enzymatischen Synthesen, insbesondere bei der  
Herstellung von Vitamin C

DE 35 02 141 C2

Figur 1



A:  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{E-FAD}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  - Cytochrome C, Phenazinmethosulfat

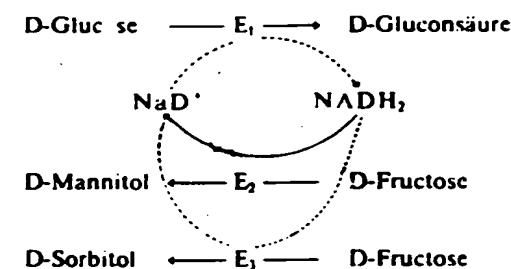
## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur intrasequentiellen Cofaktor-Regeneration bei zwei- oder mehrstufigen enzymatischen Synthesen. Die Erfindung betrifft insbesondere Verfahren zur Herstellung von Vitamin C oder L-Ascorbinsäure und zur Herstellung von Zwischenprodukten, die für die Herstellung von Vitamin C verwendet werden können (vgl. die Patentansprüche).

Chemische Reaktionen, die unter der Einwirkung von Enzymen als Katalysatoren ablaufen, besitzen unter anderem den großen Vorteil, daß die Reaktionen bei niedrigen Temperaturen durchgeführt werden, meist stereospezifisch verlaufen und der Bedarf an Hilfschemikalien minimal gehalten werden kann. Die Verwendung von Enzymen bei technischen oder halbtechnischen Synthesen hat jedoch, abgesehen von Hydrolysereaktionen, bis jetzt nur beschränkte Anwendung gefunden. Dafür gibt es eine Anzahl von Gründen. Einer der Gründe ist, daß zahlreiche Enzyme nur in Gegenwart eines Cofaktors oder Coenzyms wirksam sind. Dies gilt z. B. für die Gruppe der Dehydrogenasen. Die Regeneration der Cofaktoren, insbesondere der Coenzyme, wie beispielsweise NAD<sup>+</sup> oder FAD ist vor allem bei einer technischen Durchführung mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Es besteht daher Bedarf an enzymkatalysierten Verfahren, die auch halbtechnisch oder technisch durchgeführt werden können und bei denen Cofaktoren benötigt werden.

Je umgesetztes Mol Substrat wird normalerweise auch 1 Mol des Cofaktors benötigt, welcher oftmals wesentlich teurer ist als das zu gewinnende Produkt. Diese theoretisch unüberwindliche ökonomische Barriere kann nur dadurch genommen werden, indem man analog zu den in der lebenden Zelle ablaufenden Prozessen versucht – wie bei Enzymen üblich –, auch beim Cofaktor mit katalytischen Mengen auszukommen. Dazu benötigt man Cofaktor-Regenerationssysteme, deren Entwicklung in den letzten Jahren intensiv betrieben worden ist. Die Ergebnisse sind bisher jedoch noch bei weitem nicht optimal. Die besten Resultate wurden bei enzymatischer Coenzym-Regeneration erhalten. Das einzige kurz vor einer größeren industriellen Anwendung stehende Verfahren betrifft die Herstellung von L-Aminosäuren aus entsprechenden Ketosäuren durch reduktive enzymatische Transaminierung (M. R. Kula, C. Wandrey Bioengineering 23, S. 1341 (1981)). Für die Regeneration des im übrigen an ein lösliches Polymeres gebundenen Coenzymes wird dort ein zweites Enzym verwendet, welches während seiner Reaktion aus Aminosäure lediglich nicht störendes CO<sub>2</sub> produziert, ein jedoch letztlich nicht nutzbares Produkt.

In der DE-OS 33 26 546 wird demgegenüber erstmals ein technisch interessantes Verfahren beschrieben, bei welchem aus Gemischen von Glucose und Fructose, wie sie auch bei enzymtechnischer Hydrolyse aus Saccharose großtechnisch hergestellt werden, gleichzeitig zwei ökonomisch interessante Produkte erhalten werden. Während dabei Glucose durch Glucose-Dehydrogenase zu Gluconsäure oxidiert wird, entsteht aus der Fructose in einer v. n-Sorbitol- oder Mannitol-Dehydrogenase katalysierten Reduktionsreaktion D-Sorbitol bzw. D-Mannitol. Das in der Oxidationsreaktion reduzierte Coenzym (NAD<sup>+</sup> → NADH<sub>2</sub>) wird parallel mit der Fructose-Reduktion reoxidiert (NADH<sub>2</sub> → NAD<sup>+</sup>), so daß es für einen weiteren Cyclus zur Verfügung steht und dieser Prozeß kontinuierlich zwei Produkte bei Gegenwart nur katalytischer Mengen von Enzym und Coenzym liefern kann:

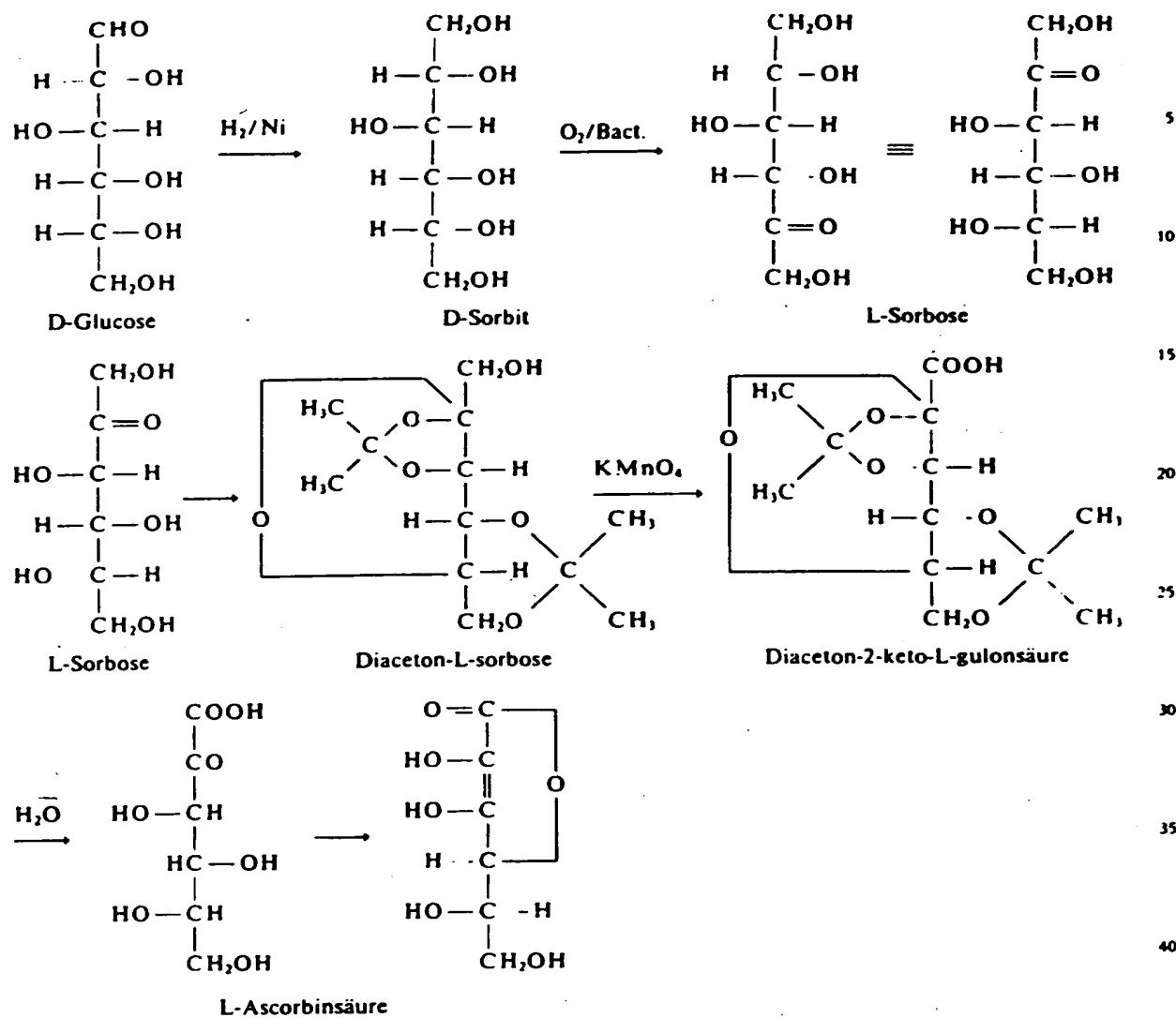


In der Literaturstelle "Vitamin C" von U. Wintermeyer et al., Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 1981, werden verschiedene Synthesen von Vitamin C beschrieben. Es finden sich jedoch keine Hinweise zur großtechnischen Herstellung von Vitamin C unter Verwendung von Enzymen als Katalysatoren.

L-Ascorbinsäure (Vitamin C) wird großtechnisch nach wie vor nach dem von T. Reichstein und A. Grüssner (Helv. Chim. Acta 17, 311 (1934)) entwickelten chemischen Syntheseverfahren, ausgehend von D-Glucose, hergestellt.

In dem folgenden Reaktionsschema sind die Einzelschritte der von Reichstein und Mitarbeitern entwickelten industriellen Synthese von L-Ascorbinsäure aus D-Glucose dargestellt.

DE 35 02 141 C2



Dabei werden folgende Stufen durchlaufen: D-Sorbit, L-Sorbose, 2-Keton-L-gulonsäure, L-Ascorbinsäure.  
 Nicht berücksichtigt wurden hierbei zwei Zwischenstufen, welche die Einführung von zwei Isopropyliden-Schutzgruppen in L-Sorbose und ihre Abspaltung aus dem Oxidationsprodukt dieses Derivats betreffen. Auch die chemische Umwandlung von 2-Keto-L-gulonsäure in L-Ascorbinsäure erfordert diese Derivatisierung.

Jeder dieser Schritte ist mit erheblichen Ausbeuteverlusten infolge der Bildung von Nebenprodukten verbunden. Insbesondere wird ein kontinuierlicher Verfahrensablauf durch die bis heute aus stereochemischen Gründen erforderliche mikrobiologische Oxidation von D-Sorbit zu L-Sorbose unterbrochen. Auch nach nunmehr jahrzehntelanger Produktionserfahrung mit der entsprechenden Fermentation durch z. B. *Gluconbacter suboxydans* oder *Acetobacter xylinus* treten bis heute erhebliche Schwierigkeiten bei der Durchführung dieses Schrittes auf (vgl. K. Dannhäuser, Chem. Rdsch. 27, 40 (1974)). Rein chemische Reaktionsschritte führen jedoch bei weitem nicht zu vergleichbaren Ergebnissen in bezug auf die Stereospezifität dieser Oxidation und somit auf die Reinheit des Produkts. Die Gesamtausbeute, bezogen auf eingesetzte Glucose, beträgt ca. 60%.

In verschiedenen Laboratorien wurde in den letzten Jahren versucht, eine kontinuierliche Produktion von L-Sorbose mit Hilfe immobilisierter Mikroorganismen zu erreichen. Bisher ist jedoch kein hinreichend befriedigendes Ergebnis erzielt worden. Außerdem muß auch hier mit ausbeutevermindernden Nebenprodukten und den daraus resultierenden Aufarbeitungsproblemen gerechnet werden.

Es ist eine Reihe rein chemischer Synthesen von L-Ascorbinsäuren entwickelt worden, die aber aus wirtschaftlichen Gründen ebenfalls keine Anwendung gefunden haben (T. C. Crawford, S. A. Crawford, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem. 37, 79 (1980)).

Rein enzymatische Syntheseverfahren für Vitamin C sind bisher nicht beschrieben worden. J. P. Danchy (US-PS 42 59 443) verwendet einen Extrakt aus keimenden Erbsensamen zur Umwandlung von Galactonon- $\gamma$ -lacton in L-Ascorbinsäure. Dieser Schritt würde aber stöchiometrische Mengen an Coenzym erfordern, was für ein Produktionsverfahren wirtschaftlich völlig untragbar wäre. Ganz davon abgesehen könnte dieser Prozeß in keinem Falle kontinuierlich geführt werden. Das bei der Verwendung einer Oxidase entstehende Nebenprodukt

DE 35 02 141 C2

dukt  $H_2O_2$  würde zudem das Enzym sehr rasch inaktivieren.

In der US-PS 26 81 858 wird die enzymatische Spaltung der Lactose durch  $\beta$ -Galactosidase in D-Galactose und D-Glucose beschrieben. Die Überführung der Glucose und Galactose in die entsprechende Uronsäure bzw. Uronsäurederivate unter Verwendung von Schutzgruppen ist ebenfalls bekannt (US-PS 42 59 443 1981; C. L. Mehlretter et al. J. Amer. Chem. Soc. 73, 2424 [1951]). Jedoch sind bei diesem bekannten Verfahren die erzielbaren Ausbeuten nicht befriedigend (50 bis 60%).

In der US-PS 42 59 443 wird ein Verfahren zur Herstellung von L-Ascorbinsäure aus Lactose

- 1) durch Hydrolyse der Lactose in D-Galactose und D-Glucose;
- 2) Oxidation der D-Galactose und D-Glucose zu D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure;
- 3) Reduktion der D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure zu der L-Galactonsäure und L-Gulonsäure;
- 4) Überführung der letztgenannten Säuren in die entsprechenden  $\gamma$ -Lactone und
- 5) enzymatische Oxidation der  $\gamma$ -Lactone zu L-Ascorbinsäure

beschrieben. Dieses bekannte Verfahren besitzt den Nachteil, daß es nicht kontinuierlich durchgeführt werden kann und daß die Ausbeuten sehr niedrig sind.

Die Weltjahresproduktion an Vitamin C betrug im Jahre 1981 ca. 35.000 Tonnen. Davon wurde ein Großteil in der Bundesrepublik Deutschland hergestellt.

60 bis 70% der Weltproduktion an L-Ascorbinsäure gehen in die Lebensmittelindustrie. Es besteht daher ein steigender Bedarf an Vitamin C.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das in technischem und halbtechnischem Maßstab durchgeführt werden kann, bei dem Enzyme als Katalysatoren eingesetzt werden und welches die Regeneration der erforderlichen Cofaktoren ermöglicht. Das erfindungsgemäße Verfahren, bei dem Enzyme verwendet werden, soll auf wirtschaftliche Weise durchgeführt werden können, ohne daß untragbare Verluste entstehen. Es soll das gewünschte Produkt in hohen Ausbeute ergeben.

Insbesondere soll erfindungsgemäß ein einfaches Verfahren zur Herstellung von Vitamin C oder seinen Vorstufen oder Zwischenprodukten zur Verfügung gestellt werden, gemäß dem Vitamin C oder seine Vorstufen oder Zwischenprodukte auf einfachere Weise und mit höheren Ausbeuten oder kostengünstiger als bei den bekannten Verfahren hergestellt werden können.

Insbesondere soll ein rein enzymatisches Verfahren zur Herstellung von L-Ascorbinsäure aus D-Galacturonsäure oder D-Glucuronsäure oder Gemischen von D-Glucuronsäure und D-Galacturonsäure zur Verfügung gestellt werden. Es soll ein Verfahren zur Verfügung gestellt werden, gemäß dem durch enzymatische/chemische Verfahren diese Uronsäuren aus Lactose oder anderen leicht zugänglichen Ausgangsmaterialien, wie z. B. Pectin oder Alginsäure, wirtschaftlich gewonnen werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren, insbesondere das Verfahren zur Herstellung von Vitamin C oder seinen Vorstufen oder Zwischenprodukten, soll sich durch folgende Vorteile auszeichnen:

1. Verwendung von preiswerten Substraten, beispielsweise für die Vitamin C-Herstellung von Lactose;
2. vollständige Verwertung der Substrate, beispielsweise der Lactose;
3. keine Nebenprodukte bei den enzymatischen Schritten;
4. hoher Reinheitsgrad des gewünschten Endprodukts;
5. geringere Umweltbelastung als bei chemischer Synthese;
6. das Verfahren soll kontinuierlich durchgeführt werden können;
7. es sollen kleinere Anlagen als bei einem chemischen Syntheseverfahren erforderlich sein und damit
8. geringere Investitionskosten benötigt werden.

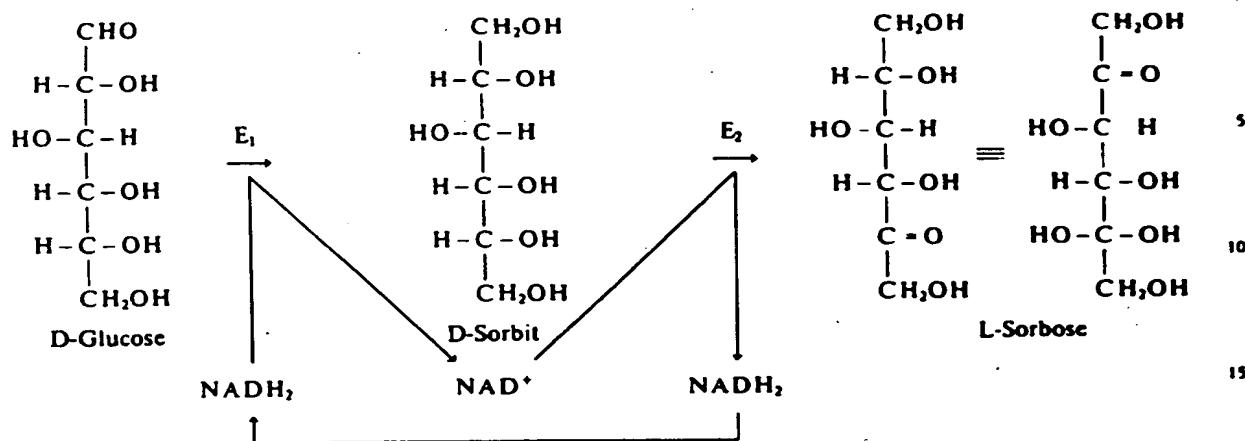
Während gemäß DE-OS 33 26 546 eine — wenn auch produktive — Hilfsreaktion zur Cofaktor-Regeneration benutzt wurde, wird nun erfindungsgemäß ein Verfahren zur intrasequentiellen Cofaktor-Regeneration insbesondere am Beispiel der Synthese von L-Ascorbinsäure beschrieben. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere für mehrstufige enzymatische Synthesen, welche Oxidations- und Reduktionsschritte innerhalb der gleichen Synthesekette enthalten.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur intrasequentiellen Cofaktor-Regeneration bei enzymatischen Synthesen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man im gleichen Reaktor

(1) ein Substrat enzymatisch reduziert und das erhaltene Reduktionsprodukt enzymatisch in ein Oxidationsprodukt überführt oder  
(2) ein Substrat enzymatisch oxidiert und das erhaltene Oxidationsprodukt enzymatisch in ein Reduktionsprodukt überführt und

das gewünschte Endprodukt in an sich bekannter Weise isoliert, wobei für die gekoppelt Oxidation und Reduktion zwei Enzyme verwendet werden, die die gleiche Cofaktorspezialität besitzen. (Dieses Verfahren ist in Fig. 1 und Fig. 3 an einigen Beispielen erläutert.)

In dem folgenden Reaktionsschema ist der enzymatische Herstellungsprozeß für L-Sorbose aus D-Glucose mit intrasequentieller Cofaktor-(hier  $NAD^+/NADH_2$ ) Regeneration dargestellt.



In der beigefügten Fig. 1 sind die enzymatischen Reaktionen schematisch dargestellt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, die Überführung eines primären Reaktionsprodukts in das oxidierte Endprodukt oder die Überführung eines primären Oxidationsprodukts in das reduzierte Endprodukt über eine oder mehrere cofakturunabhängige Zwischenstufen ablaufen zu lassen, wobei alle Reaktionen im gleichen Reaktor durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt den großen Vorteil, daß es kontinuierliche und sowohl im halbtechnischen als auch im technischen Maßstab durchgeführt werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt den wesentlichen Vorteil, daß die Cofaktoren auf einfache Weise regeneriert werden können, daß preiswerte Substrate eingesetzt werden können und die Substrate vollständig verwertet werden. Das erhaltene Endprodukt besitzt einen hohen Reinheitsgrad, so daß kaum oder keine Nebenprodukte entstehen und die Umweltbelastung sehr gering ist. Die Investitionskosten sind ebenfalls niedrig.

Die Oxidations-Reduktions-Reaktionen werden bei den Reaktionsbedingungen durchgeführt, wie sie normalerweise für die Durchführung enzymatischer Reaktionen angewandt werden; beispielsweise liegt der pH-Wert im allgemeinen zwischen 5 und 9, vorzugsweise zwischen 6 und 8.

Als Reduktionsenzym können beispielsweise L-Hexonat-Dehydrogenase, Aldose-Reduktase, Mannuronat-Dehydrogenase oder Lactat-Dehydrogenase, und als Oxidationsenzyme können L-Galactonsäure-(L-Gulonsäure)-Lacton-Dehydrogenase und L-Galactonsäure-(L-Gulonsäure)-Lactonase und Inositol-1-phosphat-Synthase, Fructuronat-Dehydrogenase oder Malat-Dehydrogenasen verwendet werden.

Der Cofaktor wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nur in katalytischen Mengen verwendet und er kann in freier Form oder an lösliche Polymere oder an Enzyme gebunden eingesetzt werden. Die Enzyme können in freier oder in immobilisierter Form verwendet werden.

Beispiele für Cofaktoren sind:

Cu<sup>2+</sup>/Cu<sup>1+</sup> in freier oder komplexierter Form.  
 Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>-Komplexe, wie K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> oder Cytochrome c.  
 Riboflavin,  
 Benzochinon-Hydrochinon,  
 α-Naphthochinon, β-Naphthochinon,  
 natürlich vorkommende oder synthetische Redoxfarbstoffe, wie 2,6-Dichlorphenolindophenol, o-Chloropheno-lindo-2,6-dichlorphenol, Methylenblau, Wurster's Blau, Triphenyltetrazoliumchlorid, Phenazinmethosulfat,  
 Coenzyme, wie NAD<sup>+</sup>/NADH<sub>2</sub>, NADP<sup>+</sup>/NADPH<sub>2</sub>, Q0, Q2, Q6, Q7, FAD/FADH<sub>2</sub> und FMN.

Bevorzugt werden die Redoxsysteme Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>/NADH<sub>2</sub>) oder Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP<sup>+</sup>/NADPH<sub>2</sub>) Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>-Cytochrom c, 2,6-Dichlorphenol-indophenol oder Phenazinmethosulfat eingesetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders gut für die enzymatische Herstellung von Vitamin C geeignet. Dabei können, wie in Fig. 2 dargestellt, die folgenden Ausgangsmaterialien verwendet werden.

- (1) D-Galacuronsäure oder D-Galacturonsäure enthaltenden natürlich vorkommende oder synthetische Polymere oder oligomere Kohlenhydrate;
- (2) D-Glucuronsäure oder D-Glucuronsäure enthaltende natürlich vorkommende oder synthetische polyme oder oligomere Kohlenhydrate;
- (3) D-Mannuronsäure oder D-Mannuronsäure enthaltende natürlich vorkommende oder synthetische polyme oder oligomere Kohlenhydrate;
- (4) D-Galactose und/oder D-Glucose und/oder D-Fructose enthaltende Dissaccharide;
- (5) D-Galactose und/oder D-Glucose und/oder D-Fructose und/oder D-Mannose;
- (6) D-Glucose, L-Galactose oder D-Mannose enthaltende Homo- oder Heteropolysaccharide (vgl. das in Fig. 4 dargestellte Reaktionsschema)

(7) myo-Inositol oder sein Hexaphosphat (Phytinsäure) oder myo-Inositol-1-phosphat;

(8) Pectine;

(9) Alginäsäure (vgl. das in Fig. 3 dargestellte Reaktionsschema):

Die Alginäsäure wird mit verdünnten Säuren oder enzymatisch durch alginolytische Enzyme, wie Alginase-Lyase (EC 4.2.2.3) oder andere Poluronasen (Alginasen) gespalten:

(10) Stärke, Maltose, Cellulose, Cellobiose oder Saccharose

Die Galacturonsäure oder D-Galacturonsäure oder Mannuronsäure enthaltenden Homo- oder Heteropolysaccharide werden chemisch oder enzymatisch hydrolysiert. Die D-Galactose oder D-Glucose oder D-Mannose-haltigen Homo- oder Heteropolymeren werden chemisch, mikrobiologisch oder enzymatisch zu den entsprechenden D-Galacturonsäure- oder D-Glucuronsäure oder D-Mannuronsäure-haltigen Verbindungen oxidiert und dann hydrolysiert.

Die Disaccharide werden chemisch, mikrobiologisch oder enzymatisch oxidiert und darauf folgend enzymatisch oder chemisch hydrolysiert, oder sie werden enzymatisch oder chemisch in ihre monomeren Bestandteile gespalten.

Die Monosaccharide werden enzymatisch oder chemisch zu den entsprechenden Uronsäuren oxidiert. Das chemische Verfahren erfordert die Einführung und spätere Entfernung von Schutzgruppen.

Stärke, Maltose, Cellobiose oder Saccharose werden enzymatisch in myo-Inositol umgewandelt und dann enzymatisch über Glucose-1-phosphat zu D-Gluconsäure oxidiert.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von L-Ascorbinsäure, bei dem als Substrat D-Galacturonsäure oder D-Glucuronsäure oder ein Gemisch dieser beiden Säuren verwendet wird. Ein Gemisch dieser beiden Säuren erhält man beispielsweise durch chemische oder enzymatische Oxidation zusammen mit einer Hydrolyse aus Lactose.

Die beiden genannten Säuren oder das Gemisch der Säuren werden enzymatisch zu L-Galactonsäure oder L-Gulonsäure oder einem Gemisch dieser Säuren reduziert, und diese werden gegebenenfalls in ihre Lactone oder ein Gemisch der Lactone überführt. Die Säuren oder ein Gemisch der Säuren oder die Lactone oder ein Gemisch der Lactone werden dann enzymatisch zu den entsprechenden 2-Keto-Säuren oxidiert. Ascorbinsäure umgelagert, welche in an sich bekannter Weise isoliert wird.

Es ist ein besonderer Vorteil des erfundungsgemäßen Verfahrens, daß im gleichen Reaktor nicht nur die Oxidations- und Reduktions-Reaktionen, sondern auch Zwischenreaktionen, wie beispielsweise die Lactonisierung oder Überführung der Säuren in andere Derivate durchgeführt werden können. Anhand der beigefügten Fig. 5 wird das erfundungsgemäße Verfahren zur Herstellung von L-Ascorbinsäure aus Lactose näher erläutert.

In einer ersten Verfahrensstufe wird dazu aus Lactose durch chemische oder enzymatische Oxidation in Kombination mit einem Hydrolyseschritt ein Gemisch von D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure gewonnen. In einem zweiten enzymkatalysierten Reduktionsprozeß wird aus diesen beiden D-Uronsäure unter Konfigurationsumkehr (Inversion) ein Gemisch von L-Galactonsäure und L-Gulonsäure erzeugt. Die daraus durch enzymatische Oxidation erhaltenen 2-Keto-L-Galactonsäure und 2-Keto-L-Gulonsäure oder deren  $\gamma$ -Lactone (Stufe 3) gehen unkatalysiert in L-Ascorbinsäure (Vitamin C) über.

Durch Auswahl geeigneter Enzyme ( $E_1$ ,  $E_2$ ) mit kompatiblen Cofaktoren lassen sich der Reduktions schritt (Stufe 2,  $E_1$ ) und der Oxidations schritt (Stufe 3,  $E_2$ ) miteinander zu einem kontinuierlichen Prozeß verknüpfen. Mit diesen konjugierten Redoxreaktionen wird gleichzeitig für eine kontinuierliche Regeneration der in den von  $E_1$  oder  $E_2$  katalysierten Einzelschritten jeweils benötigten Coenzyme (Redoxsysteme) gesorgt, so daß diese nur in katalytischen Mengen eingesetzt zu werden brauchen.

Die bei dem erfundungsgemäßen Verfahren anfallenden Endprodukte können in an sich bekannter Weise abgetrennt werden und müssen aus dem Gleichgewicht entfernt werden. Sie können beispielsweise durch Absorptionschromatographie, Verteilungschromatographie, Ionenaustauschchromatographie oder fraktionierte Kristallisation abgetrennt oder isoliert werden.

Die bei dem oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Vitamin C verwendete D-Glucuronsäure kann ebenfalls erfundungsgemäß durch enzymatische Reduktion von L-Mannuronsäure zu D-Mannuronsäure und anschließende Oxidation der D-Mannuronsäure zu D-Fructuronsäure und Isomerisierung der D-Fructuronsäure zu D-Glucuronsäure hergestellt werden. Damit kommt auch Alginäsäure als preiswertes Ausgangsmaterial in Frage (vgl. Fig. 3).

L-Sorbit ist ein Zwischenprodukt zur Herstellung von Vitamin C, und diese Verbindung kann aus D-Glucose oder aus D-Fructose hergestellt werden. D-Glucose oder D-Fructose werden enzymatisch zu D-Sorbit reduziert und D-Sorbit wird enzymatisch zu L-Sorbitose oxidiert.

Es ist ein weiterer Vorteil des erfundungsgemäßen Verfahrens, daß eine Umwandlung der D-Formen in die gewünschte L-Form auf enzymatische Weise erfolgen kann. Derartige Umwandlungen sind sonst nur schwer zu erreichen und werden in der Reichstein-Synthese deshalb mikrobiologisch vorgenommen (vgl. die obigen Reaktionsschemata).

Die erfundungsgemäßen Oxidations-Reduktionsreaktionen können beispielsweise in einem Reaktor mit Ultrafiltrationsmembran durchgeführt werden, wobei ein Cofaktorsystem verwendet wird, das an ein wasserloses Polymeren mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 5000 und 30 000 Dalton gebunden ist. Über die Membran des Reaktors wird eine Druckdifferenz erzeugt, und hinter der Membran wird kontinuierlich ein Produktstrom abgeführt.

Erfundungsgemäß kann man als Membranen Hohlfasern verwenden, die in ihrer Struktur asymmetrisch aufgebaut sind, wobei die für Enzyme und polymer gebundene Coenzyme undurchlässige selektive Schicht der Membran auf der Außenseite der Hohlfaser liegt, während die Innenseite der Faser Poren erhält, die auch für die Enzyme und Coenzyme durchlässig sind.

# DE 35 02 141 C2

Die Substratlösung wird dann auf der Innenseite der Hohlfasermembran eingeführt, zwischen der Innen- und Außenwand der Faser wird eine hydrostatische Druckdifferenz erzeugt, so daß die Substratlösung durch die innere Faserwand hindurchgeht und die enzymatischen Reaktionen bevorzugt im porösen Stützmaterial zwischen Innenwand und Außenwand ablaufen.

Durch geeignete Wahl der hydrostatischen Druckdifferenz kann man den Durchsatz der Substrate so einstellen, daß ihre Aufenthaltszeit in der Hohlfaserwand ausreicht, um eine möglichst vollständige Umsetzung zu erzielen.

Gemäß einer anderen Ausführungsform kann die eigentliche, für Enzyme und polymergebundene Cofaktoren und glässige selektive Schicht der Membran auf der Innenseite der Hohlfaser liegen und die enzymatische Reaktion im Lumen der Hohlfaser ablaufen. Zu der Reaktionslösung kann man gegebenenfalls ein Schutzprotein in einer Menge, die dem 1- bis  $10^4$ -fachen der Menge der beteiligten Enzyme entspricht, zusetzen.

Das Gemisch aus Restsubstrat, Produkt, Enzym und Cofaktor kann auch durch ein Membranmodul durchgeströmt werden, dessen Membranporen so ausgestaltet sind, daß sie nur das Produkt sowie Restsubstrat hindurchlassen, die übrigen Komponenten jedoch zurückhalten, wobei letztere wieder in den Reaktor zurückgeführt werden.

Die im Reaktor gemeinsam vorliegenden Enzyme können verschiedene Halbwertszeiten ihrer Inaktivierung aufweisen. Um über einen längeren Zeitraum hinweg den Reaktor funktionsfähig zu halten, werden die Enzyme dem Reaktor in einem Aktivitätsverhältnis zwischen 10 : 1 und 1 : 10 zugesetzt, wobei das Enzym mit der schnelleren Inaktivierung anfangs im Überschuß vorliegt. Auch durch Nachdosierung einzelner gelöster Enzyme oder des Cofaktors während des Produktionsprozesses können die Substratumsatzraten je Zeiteinheit von Vorwärts- und Rückwärtsreaktion wieder aufeinander abgestimmt werden.

Einige der benötigten Enzyme sind wie im Falle der Sorbitol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.14) aus Schafsleber oder *Candida utilis*, oder der Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) aus verschiedenen tierischen Geweben oder der Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.38) aus Schweineherz oder der Pectinasen im Handel erhältlich. Letztere Quellen können auch zur Reindarstellung pectinolytischer Enzyme verwendet werden.

Die weiteren Enzyme lassen sich z. B. aus folgenden Quellen isolieren:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 35 02 141 C2

Sorbitol-DH	EC 1.1.1.14	Lactobacillus brevis, Zymomonas mobilis, Gluconobacter sp.
Glucuronat-Reduktase	1.1.1.19	Leber, Hefen
L-Hexonat-Dehydrogenase	1.1.1.20	Bacillus subtilis, E. coli, Erwinia carotovora, Euglena gracilis, Erbsen
Aldose-Reduktase	1.1.1.21	Leber, Zymomonas mobilis
Lactat-DH	1.1.1.27	Bacillus subtilis
Malat-DH	1.1.1.37	Neurospora crassa, B. subtilis
Malat-DH, o decarboxylierend	1.1.1.38	Bakterien
Fructuronat-Reduktase	1.1.1.57	Streptococcus faecalis
Mannitol-DH (NAD)	1.1.1.67	Bakterien
L-Sorbose-DH	1.1.1.123	Bakterien, Hefen Gluconobacter sp., Lactobacillus brevis, E. coli
Fructose-5-DH	1.1.1.124	Gluconobacter cerinus
Mannuronat-DH	1.1.1.131	Aeromonas
Mannitol-DH (NADP)	1.1.1.138	Lactobacillus brevis, Penicillium chrysogenum
Polyol-DH	1.1.1.139	Saccharomyces
L-Aldono- $\gamma$ -lacton-Oxidase	1.1.3.8	Serratia, Saccharomyces cerevisiae, Pseudomonas, Grünalgen, Leber
Mannitol-DH (Fe-Cytochrom c)	1.1.2.2	Aerobacter suboxidans, Bac. polymyxa
Mannonat-DH	1.2.1.34	Bakterien
L-Aldono- $\gamma$ -lacton-DH	1.3.2.3	Erbsen, Blumenkohl, Hefen
myo-Inositol-Oxygenase	1.13.1.11	Rattenniere, Pflanzen
Phosphorylase	2.4.1.1	Kartoffeln, Tomaten
Saccharose-Phosphorylase	2.4.1.7	Pseudomonas saccharophilia
Maltose-Phosphorylase	2.4.1.8	Leuconostoc mesenteroides
Cellobiose-Phosphorylase	2.4.1.20	Bakterien
x Phosphoglucosemutase	2.7.5.5	Bakterien
Pectinmethylesterase	3.1.1.11	Aspergillus niger
L-Aldonolactonase	3.1.1.18	Leber, Grünalgen
Phytin-3-phosphatase	3.1.3.8	Bakterien
myo-Inositol-1-phosphatase	3.1.3.25	Aspergillus sp., Hefe
Phytin-6-phosphatase	3.1.3.26	Pflanzen
Endo-Polygalacturonase	3.2.1.15	Aspergillus niger
Exo-Polygalacturonase	3.2.1.67	Äpfel, Zitrusfrüchte
Exo-Poly- $\alpha$ -Galacturonosidase	3.2.1.82	dto, Erwinia
Alginäure-Lyase	4.2.2.3	Bakterien
Glucuronat-Isomerase	5.3.1.12	E. coli
myo-Inositol-1-phosphat-Synthase	5.5.1.8	Schwanniomyces occidentalis, Candida utilis
L-Sorbose-DH		Bacillus, Hefen, Gluconobacter melanogenum
L-Sorbozon-DH		Acetobacter suboxidans, Gluconobacter melanogenum
L-Sorbozon-Oxidase		Pseudomonas putida, Gluconobacter melanogenum
Alginasen		Alginobacter, Alginomonas, Alginovibrio

50

Patentansprüche

1. Verfahren zur intrasequentiellen Cofaktor-Regeneration bei zwei- oder mehrstufigen enzymatischen Synthesen, dadurch gekennzeichnet, daß man im gleichen Reaktor
  - (1) ein Substrat enzymatisch reduziert und das dabei erhaltene Reduktionsprodukt enzymatisch in ein Oxidationsprodukt überführt oder
  - (2) ein Substrat enzymatisch oxidiert und das dabei erhaltene Oxidationsprodukt enzymatisch in ein Reduktionsprodukt überführt und
- das gewünschte Endprodukt in an sich bekannter Weise isoliert, wobei für die gekoppelten Vorgänge der Oxidation und Reduktion zwei Enzyme verwendet werden, die die gleiche Cofaktor-Spezifität besitzen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Überführung des primären Reduktionsprodukts in das oxidierte Endprodukt oder die Überführung des primären Oxidationsprodukts in das reduzierte Endprodukt über eine oder mehrere von dem jeweils betroffenen Cofaktor unabhängige Zwischenstufen abläuft, die im gleichen Reaktor durchgeführt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es kontinuierlich durchgeführt wird.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Reduktionsenzyme L-Hexonat-Dehydrogenase, Aldose-Reduktase, Mannuronat-Dehydrogenase oder Lactat-Dehydro-

DE 35 02 141 C2

genase, als Oxidationsenzyme, L-Galactonsäure-(L-Gulonsäure)-Lacton-Dehydrogenase, Inositol-1-phosphat-Synthase, Fructuronat-Dehydrogenase oder Malat-Dehydrogenasen verwendet werden.

5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Cofaktor in katalytischen Mengen verwendet wird.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Cofaktor  $Cu^{2+}/Cu^{1+}$  in freier oder komplexierter Form,  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ -Komplexe, Riboflavin, Benzochinon/Hydrochinon,  $\alpha$ -Naphthochinon,  $\beta$ -Naphthochinon, natürlich vorkommende oder synthetische Redoxfarbstoffe oder Coenzymssysteme, verwendet werden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Redoxsysteme Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $NAD^+/NADH_2$ ), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat ( $NADP^+/NADPH_2$ ),  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ -Cytochrome c, 2,6-Dichlorphenol-Indophenol oder Phenazinmethosulfat verwendet werden.

8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Cofaktor in freier Form oder an Partikel oder an lösliche Polymere oder an Enzyme gebunden und die Enzyme in freier oder in immobilisierter Form verwendet werden.

9. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche zur enzymatischen Herstellung von L-Ascorbinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man als Substrat D-Galacturonsäure oder ein Gemisch dieser beiden Säuren verwendet, das jeweilige Substrat enzymatisch zu L-Galactonsäure oder L-Gulonsäure oder einem Gemisch dieser Säuren reduziert und L-Galactonsäure oder L-Gulonsäure oder ein Gemisch dieser Säuren in die entsprechenden  $\gamma$ -Lactone oder das Gemisch der  $\gamma$ -Lactone enzymatisch oder chemisch in an sich bekannter Weise überführt, das erhaltene  $\gamma$ -Lacton oder das Gemisch aus den  $\gamma$ -Lactonen enzymatisch zu 2-Keto-L-gulonsäure oder 2-Keto-L-galactonsäure oder einem Gemisch dieser Säuren oder zu den  $\gamma$ -Lactonen oder einem Gemisch der  $\gamma$ -Lactone der 2-Keto-L-gulonsäure oder 2-Keto-L-galactonsäure oxidiert und in an sich bekannter Weise zu L-Ascorbinsäure umlagert und das Produkt gewinnt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Reduktion als Enzyme L-Hexonat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.20) oder Glucuronat-Reduktase (EC 1.1.1.19) bei der Oxidation L-Aldono- $\gamma$ -lacton-Oxidase (EC 1.1.3.8) oder L-Alidonsäure- $\gamma$ -lacton-Dehydrogenase (EC 1.3.2.3) verwendet werden und daß die Überführung der -onsäuren in die  $\gamma$ -Lactone durch eine L-Aldonolactonase (EC 3.1.1.18) oder eine schwache Säure erfolgt.

11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung von D-Gluconsäure, dadurch gekennzeichnet, daß

- i. D-Mannuronsäure enzymatisch zu D-Mannonsäure reduziert wird;
- ii. die D-Mannonsäure anschließend enzymatisch zu D-Fructuronsäure oxidiert wird und
- iii. die Fructuronsäure zu D-Glucuronsäure isomerisiert wird.

— 12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 zur enzymatischen Herstellung von L-Sorbose aus Glucose, dadurch gekennzeichnet, daß

- i. D-Glucose zu D-Sorbitol unter Verwendung einer Aldose-Reduktase (EC 1.1.1.21) enzymatisch reduziert wird und
- ii. D-Sorbitol zu L-Sorbose enzymatisch unter Verwendung einer Sorbitol-Dehydrogenase, L-Iditol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.14) oder L-Sorbose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.123) oxidiert wird

13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 zur enzymatischen Herstellung von L-Sorbose aus D-Fructose, dadurch gekennzeichnet, daß

- i. D-Fructose zu D-Sorbitol enzymatisch unter Verwendung von Sorbitol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.14) oder einer Polyoldehydrogenase (EC 1.1.1.139) reduziert wird,
- ii. D-Sorbitol zu L-Sorbose unter Verwendung von einer Sorbitol-Dehydrogenase, L-Iditol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.14) oder L-Sorbose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.123) oxidiert wird.

14. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 zur enzymatischen Herstellung von L-Sorbose aus D-Fructose, dadurch gekennzeichnet, daß

- i. D-Fructose durch eine 5-Keto-Fructose-Reduktase aus *Gluconobacter cerinus* (EC 1.1.1.124; EC 1.1.9.11) zu 5-Keto-Fructose enzymatisch oxidiert wird und
- ii. 5-Keto-Fructose durch eine 5-Keto-Fructose-Reduktase aus Hefe (EC 1.1.1.123; EC 1.1.99.12) enzymatisch zu L-Sorbose reduziert wird.

15. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung von 2-Keto-L-gulonsäure aus L-Sorbose, dadurch gekennzeichnet, daß

- i. L-Sorbose zu L-Sorboson unter Verwendung von L-Sorbose-Dehydrogenase oxidiert wird und
- ii. L-Sorboson unter Verwendung von L-Sorboson-Oxidase oder L-Sorboson-Dehydrogenase zu 2-L-Ketogulonsäure oxidiert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden oxidativen Dehydrogenase-Reaktionen, die zur Bildung von 2-Keto-L-gulonsäure aus L-Sorbose führen, mit der reduktiven Umsetzung von D-Fructose zu Mannitol mittels Mannitol-Dehydrogenase gekoppelt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterialien

- (1) D-Galacturonsäure enthaltende natürlich vorkommende oder synthetische polymere oder oligomere Kohlehydrate;
- (2) D-Glucuronsäure enthaltende natürlich vorkommende oder synthetische polymere oder oligomere Kohlehydrate;
- (3) D-Mannuronsäure enthaltende natürlich vorkommende oder synthetische polymere oder oligomere Kohlehydrate;
- (4) D-Galactose und/oder D-Glucose und/oder D-Fructose enthaltende Disaccharide;
- (5) D-Galactose und/oder D-Glucose und/oder D-Fructose und/oder D-Mannose;

# DE 35 02 141 C2

(6) D-Glucose, D-Galactose oder D-Mannose enthaltende Homo- oder Heteropolyglykane;

(7) myo-Inositol oder sein Hexaphosphat (Phytinsäure) oder myo-Inositol-1-phosphat;

(8) Pectine;

(9) Alginsäure;

(10) Stärke, Maltose, Cellobiose, Lactose oder Saccharose verwendet werden.

18. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung von L-Ascorbinsäure aus Pectinen durch

(1) Hydrolyse des Pectins zu Pectinsäure;

(2) Hydrolyse der Pectinsäure zu D-Galacturonsäure;

(3) Lactonisierung der L-Galacturonsäure zu ihrem  $\gamma$ -Lacton;

(4) Reduktion der Galacturonsäure oder ihres  $\gamma$ -Lactons zu L-Galactonsäure oder dessen  $\gamma$ -Lacton;

(5) Oxidation des L-Galactonsäure- $\gamma$ -lactons zu 2-Keto-L-Galactonsäure- $\gamma$ -lacton sowie Umlagerung zu L-Ascorbinsäure,

dadurch gekennzeichnet, daß

a) die Stufen (1) und (2) getrennt oder in einem gemeinsamen Reaktor durchgeführt werden;

b) die Stufen (3), (4) und (5) gemeinsam in einem Reaktor durchgeführt werden;

c) die Hydrolyse-Reaktionen (1) und (2) enzymatisch ablaufen;

d) die Bildung des L-Galactonsäure- $\gamma$ -lactons (3) enzymatisch oder chemisch vorgenommen wird;

e) die Reduktion der D-Galacturonsäure oder ihres  $\gamma$ -Lactons zu L-Galactonsäure (4) oder ihres  $\gamma$ -Lactons enzymatisch erfolgt;

f) die Oxidation des L-Galactonsäure- $\gamma$ -lactons zu 2-Keto-L-gulonsäure- $\gamma$ -lacton enzymkatalysiert abläuft und

g) die Reaktionen (4) und (5) über ein gemeinsames Redoxsystem (Cofaktorsystem) miteinander verknüpft sind.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der gekoppelte Reduktions- (7) und Oxidationsprozeß (5) mit Hilfe des intersequentiellen Regenerationssystems g) kontinuierlich durchgeführt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Hydrolyseenzym (1) Pectinmethylesterase (EC 3.1.1.11), als Hydrolyseenzym(e) (2) ein Komplex oder ein Gemisch aus Endo-Polygalacturonase (EC 3.2.1.15) und Exo-Polygalacturonase (EC 3.2.1.67) sowie Exo-Poly- $\alpha$ -D-Galacturonosidase (EC 3.2.1.82), als Reduktionsenzym (4) eine L-Hexonat-Dehydrogenase oder eine D-Glucuronat-Reduktase (EC 1.1.1.19), zur Bildung des entsprechenden  $\gamma$ -Lactons (3) eine L-Aldono-Lactonase (EC 3.1.1.18) oder eine schwache Säure und als Oxidationsenzym eine L-Galactonsäure- $\gamma$ -lacton-Dehydrogenase verwendet werden.

21. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung von Ascorbinsäure aus Alginsäure durch

(1) Hydrolyse der Alginsäure zu D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure;

(2) Reduktion der D-Mannuronsäure zu D-Mannonsäure;

(3) Oxidation der D-Mannonsäure zu D-Fructuronsäure und

(4) Isomerisierung der D-Fructonsäure zu D-Glucuronsäure;

(5) Umwandlung von D-Glucuronsäure in L-Ascorbinsäure gemäß Anspruch 9.

dadurch gekennzeichnet, daß

a) die Stufen (2), (3) und (4) gemeinsam in einem Reaktor durchgeführt werden;

b) die Hydrolysereaktion (1) enzymatisch oder chemisch abläuft;

c) die Reduktion von D-Mannuronsäure zu D-Mannonsäure (2) enzymatisch erfolgt;

d) die Oxidation von D-Mannonsäure zu D-Fructuronsäure (3) enzymatisch katalysiert wird;

e) die Isomerisierung von D-Fructonsäure zu D-Gluconsäure (4) sowohl chemisch als auch enzymatisch durchgeführt wird, und

f) die Reaktionen (2) und (3) über ein gemeinsames Redoxsystem (Cofaktorsystem) miteinander verknüpft sind.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der gekoppelte Reduktions- (2) und Oxidationsprozeß (3) mit Hilfe des intrasequentiellen Cofaktor-Regenerationssystems kontinuierlich durchgeführt wird.

23. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrolytische Spaltung der Alginsäure (1) mit verdünnten Säuren oder enzymatisch durch alginolytische Enzyme erfolgt, für den Reduktionsschritt (2) eine D-Mannuronat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.131) oder eine D-Mannonat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.34), für den Oxidationsschritt (3) eine Fructuronat-Reduktase (EC 1.1.1.57) und für die Isomerisierung zu D-Glucuronsäure (4) eine Glucuronat-Isomerase (EC 5.3.1.12) oder eine verdünnte Säure verwendet werden.

24. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9 zur enzymatischen Herstellung von Glucuronsäure aus Stärke, Saccharose, Maltose, Cellobiose oder Phytinsäure durch

(1) phosphorolytische Spaltung der betreffenden Poly- oder Disaccharide zu Glucose-1-phosphat;

(2) Isomerisierung zu Glucose-6-phosphat;

(3) oxidative Cyclisierung zu Inositol-1-phosphat;

(4) Hydrolyse des Phosphatrests in 1-Stellung;

(5) Oxidation des myo-Inosits zu D-Glucuronsäure oder

dadurch gekennzeichnet, daß  
65 (6) Hydrolyse der Phosphatreste von Phytinsäure (myo-Inositol-hexaphosphat) und anschließende Oxidation geinäß (5).

- a) die phosphorolytische Spaltung (1) enzymatisch erfolgt;
- b) die Isomerisierung (2) enzymatisch durchgeführt wird;
- c) die oxidative Bildung des Cyclitols (3) enzymatisch erfolgt;
- d) die Abspaltung der Phosphatreste (4), (6) durch enzymatischen Angriff oder chemisch erfolgt und
- e) die Oxidationsreaktion (5) enzymatisch durchgeführt wird.

25. Verfahren nach Anspruch 24 zusammen mit dem Verfahren der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die oxidative Cyclisierung von Glucose-6-phosphat zu myo-Inositol-1-phosphat (3) mit der Reduktion von D-Glucuronsäure (oder ihrem  $\gamma$ -Lacton) zu Gulonsäure (oder ihrem  $\gamma$ -Lacton) über einen gemeinsamen Cofaktor (Redoxsystem) miteinander verknüpft ist und diese beiden Reaktionen gemeinsam mit (4) und (5) im gleichen Reaktor kontinuierlich ablaufen und in diesem Fall die weitere Oxidation von L-Gulonsäure- $\gamma$ -lacton zu 2-Keto-L-gulonsäure- $\gamma$ -lacton durch eine Oxidase katalysiert wird.

26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß die phosphorolytische Spaltung von Stärke oder Saccharose (1) mit Phosphorylasen (EC 2.4.1.1; EC 4.2.1.7) erfolgt und für die Isomerisierung (2) eine Phosphorglucomutase (EC 2.7.5.5), für den Prozeß der oxidativen Cyclisierung (3) eine myo-Inositol-1-phosphat-Synthase (EC 5.5.1.8), für die hydrolytische Abspaltung der Phosphatreste (4), (6) spezifische Phosphatasen (EC 3.1.3.8; EC 3.1.3.25; EC 3.1.3.26), für die Oxidationsreaktionen zu D-Glucuronsäure (5) eine myo-Inositol-Oxygenase (EC 1.13.1.11) und für die Oxidation von L-Gulonsäure- $\gamma$ -lacton eine L-Gulonolacton-Oxidase (EC 1.1.3.8) verwendet werden.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

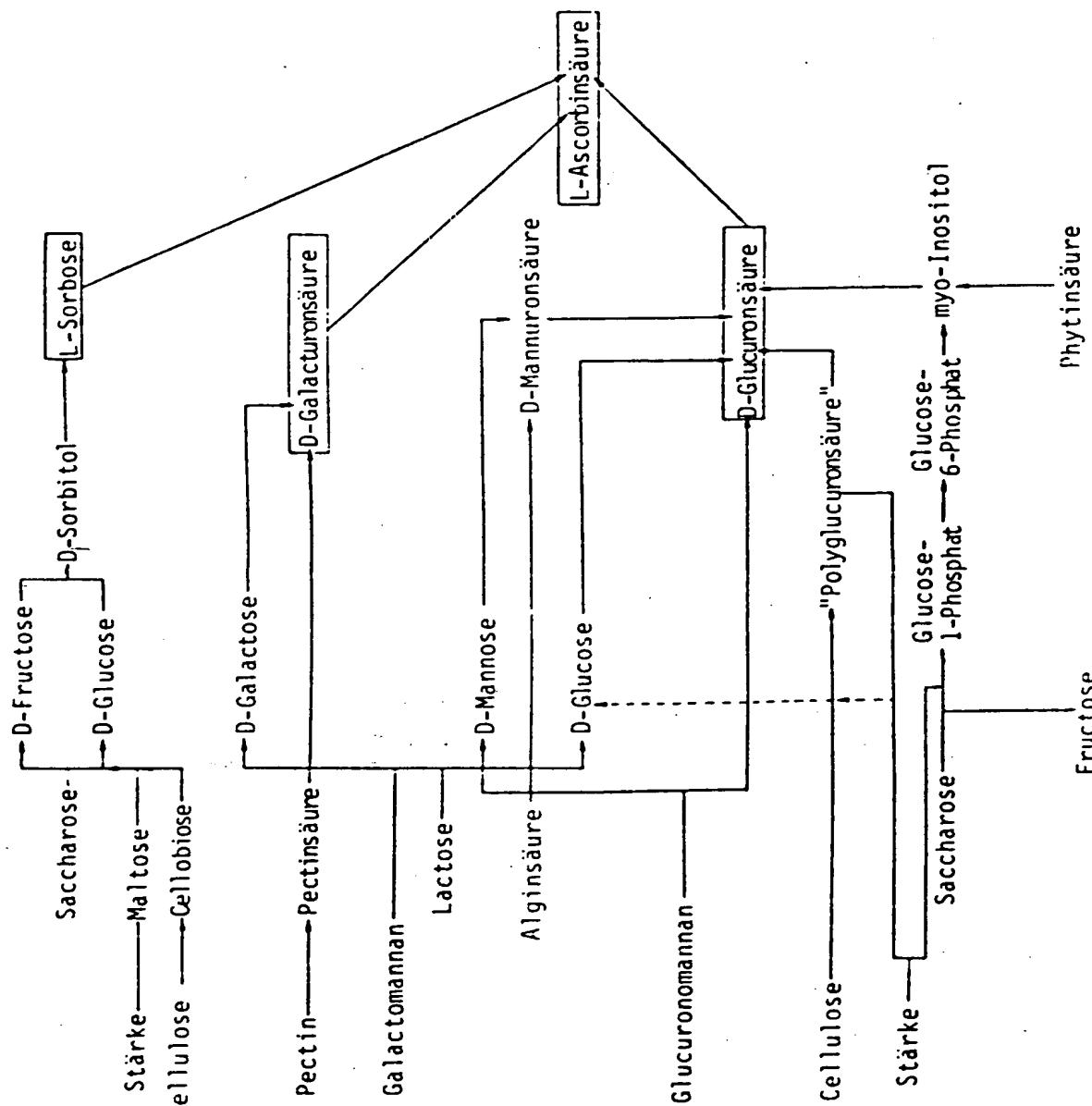
45

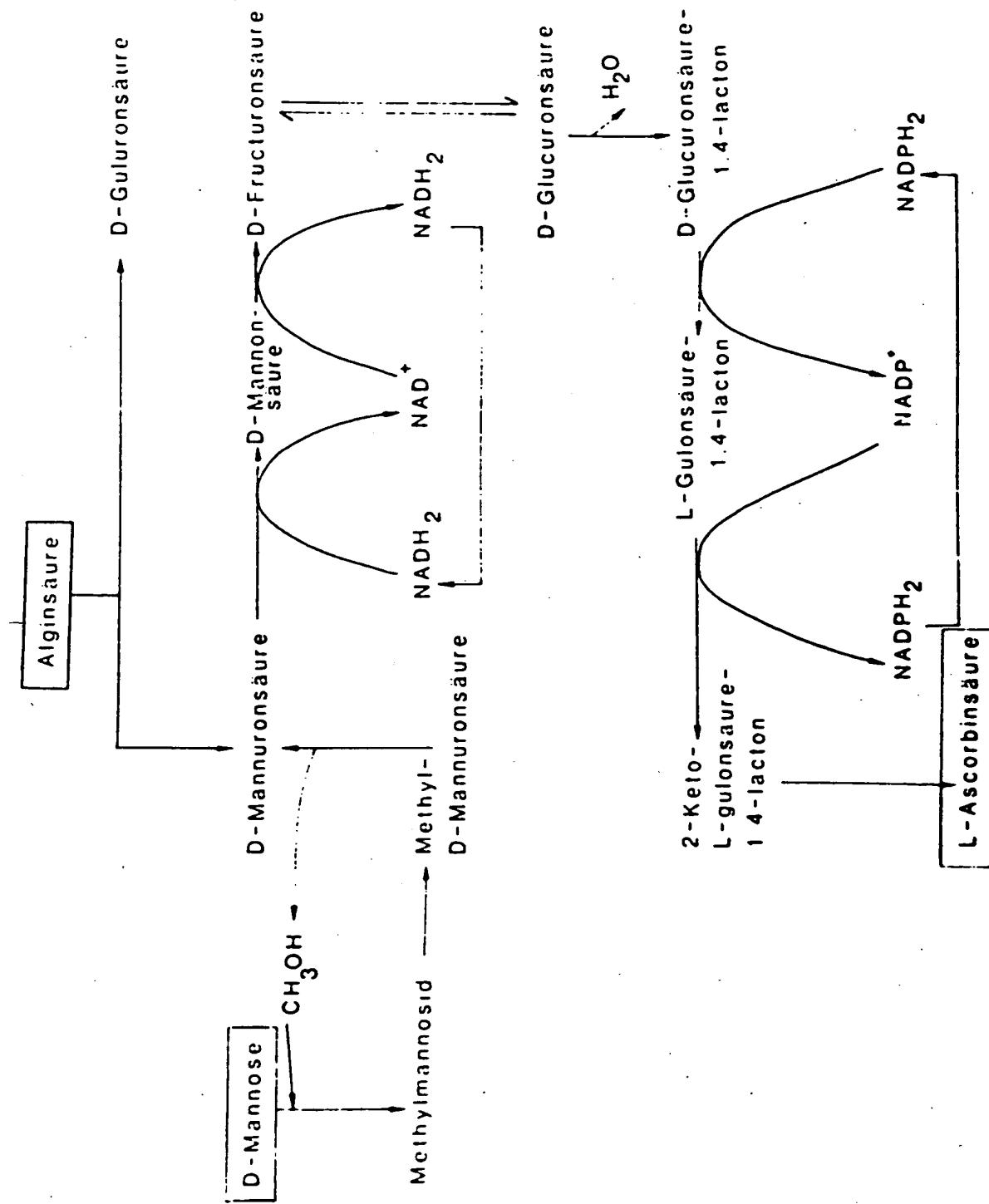
50

55

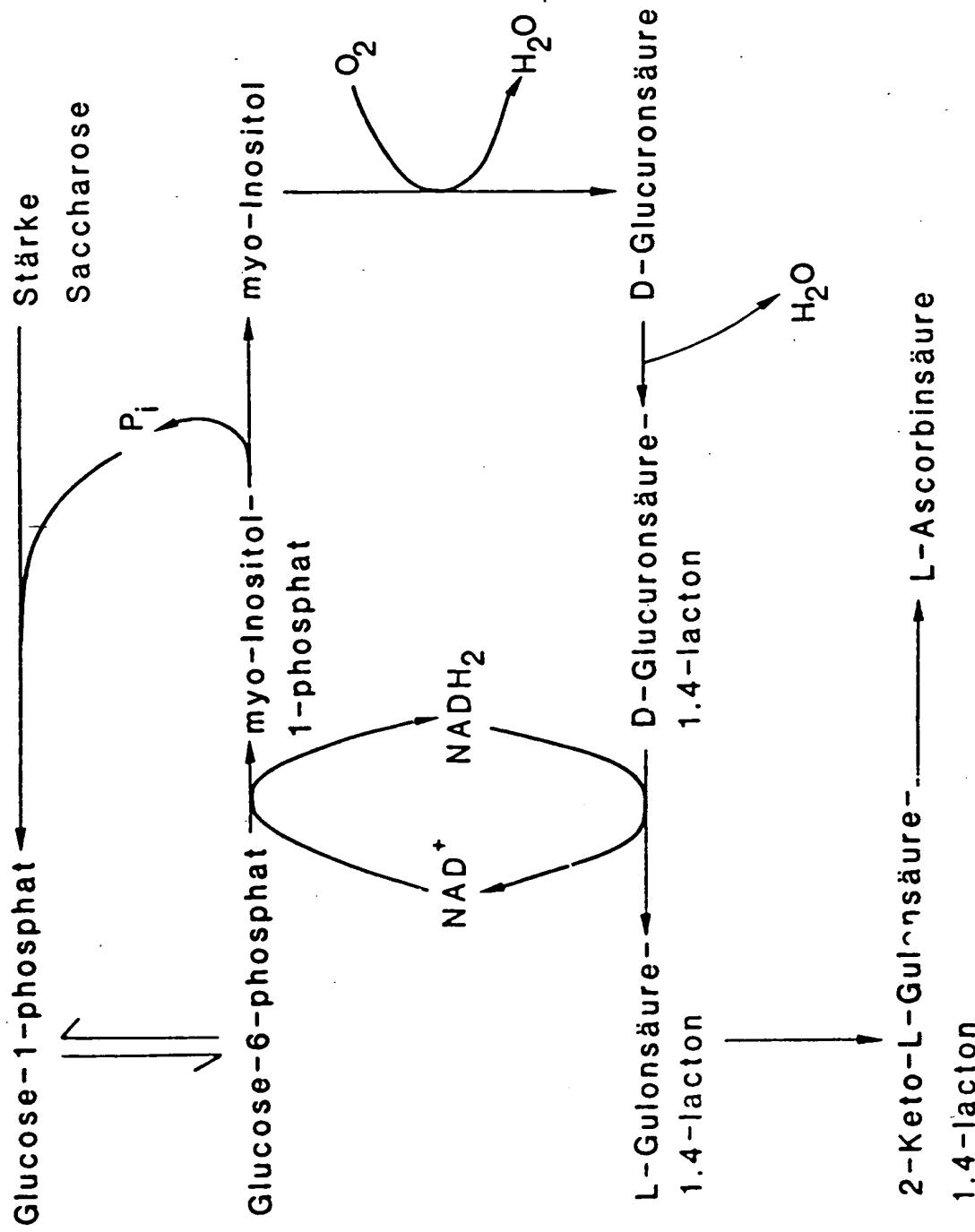
60

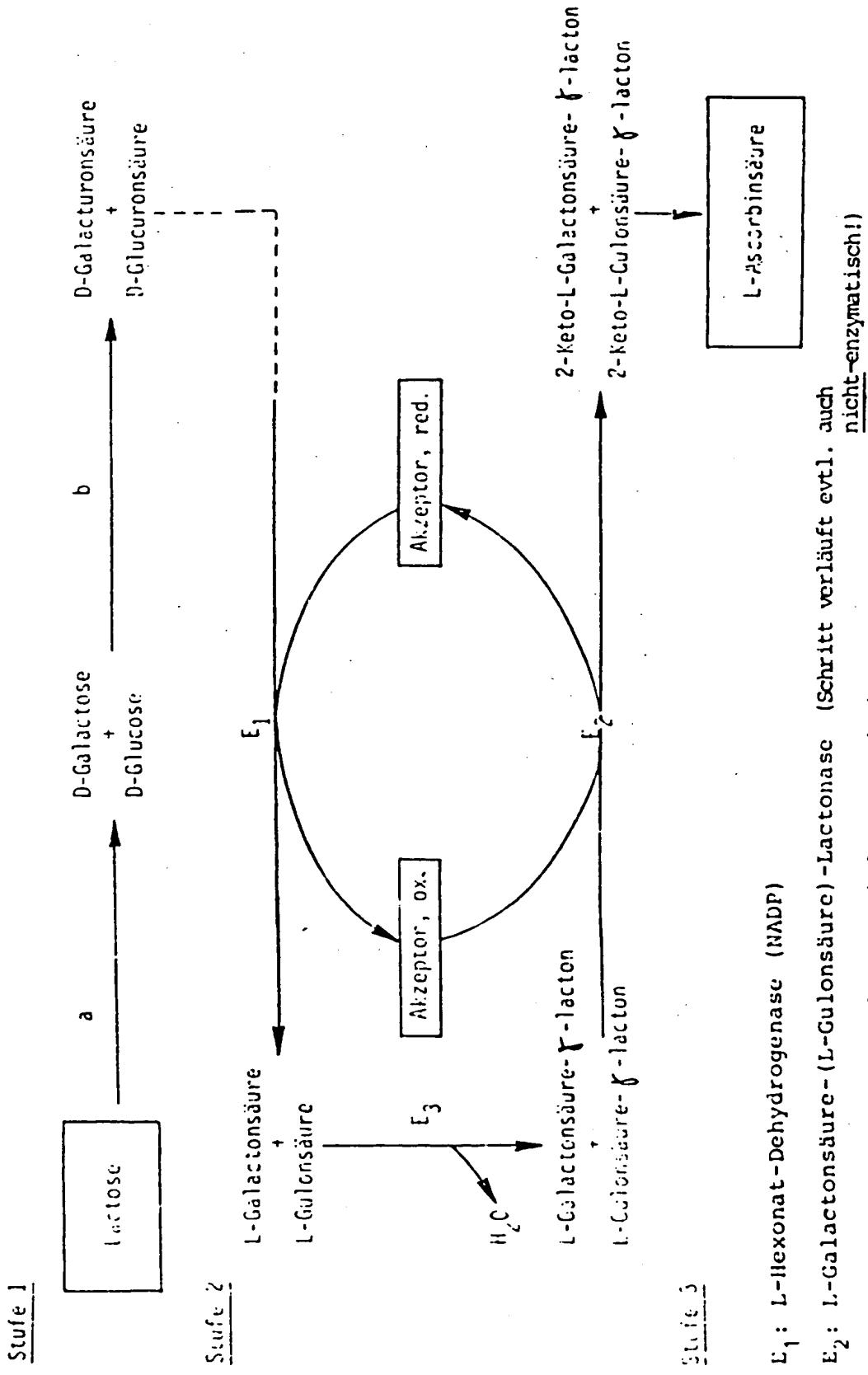
65





FIGUR 4





E<sub>1</sub>: L-Hexonat-Dehydrogenase (NADP)

E<sub>2</sub>: L-Galactonsäure-(L-Gulonsäure)-Lactonase (Schritt verläuft evtl. auch nicht-enzymatisch!)

E<sub>3</sub>: L-Gulonsäure-(L-Gulonsäure)-lacton-Dehydrogenase